

بررسی حساسیت حشرات کامل *Aphidius nigripes* (Hym.: Aphididae) به قارچ

Lecanicillium muscarium (Deut.: Moniliales) بیماری‌گر

حسن عسکری* و مریم عجم حسینی

موسسه‌ی تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵، تهران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: askary@ppdri.ac.ir

Susceptibility of *Aphidius nigripes* (Hym.: Aphididae) adults to entomopathogen *Lecanicillium muscarium* (Deut.: Moniliales)

H. Askary* and M. Ajam Hassany

Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran.

*Corresponding author, Email: askary@ppdri.ac.ir

چکیده

حساسیت حشرات کامل *Aphidius nigripes* Ashmead به قارچ *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams با روش‌های مختلف آلوده شدن بررسی شد. غلظت‌های قارچ شامل 10^4 ، 10^5 ، 10^6 ، 10^7 ، 10^8 اسپور در میلی‌لیتر و شاهد (آب مقطر به همراه تریتون X-100 به میزان ۰/۰۴٪) به روش محلول‌پاشی، و یا غوطه‌وری زنبورهای نر، ماده و شفیره‌های پارازیتوئید به کار رفته و مرگ و میر آن‌ها در مدت ۸ روز، محاسبه شد. حشرات کامل زنبور نر و ماده از طریق آلودگی مستقیم بیشترین حساسیت را نسبت به قارچ نشان داده و آلوده شدند. کمترین میزان تلفات پس از ۸ روز مربوط به غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر برای حشرات نر و ماده بود. روند افزایش مرگ و میر در جمعیت زنبورها با افزایش غلظت رابطه‌ی مستقیم داشت. بیشترین میزان مرگ و میر مربوط به آلوده‌سازی زنبورها به روش مستقیم با غلظت 10^8 اسپور در میلی‌لیتر با ۹۷/۹٪ برای حشره‌ی ماده و ۱۰۰٪ برای حشره‌ی نر بود. مقدار LC_{50} محاسبه شده‌ی قارچ برای حشره‌ی ماده تقریباً سه برابر بیشتر از حشره‌ی نر بود. میزان LT_{50} نیز برای غلظت‌های بالا محاسبه شد که نتیجه، مؤید حساسیت بیشتر حشره‌ی نر نسبت به حشره‌ی ماده در مقابل قارچ بود. حشرات کامل زنبور از طریق تماس با گیاهان آلوده به قارچ نیز بیمار شدند، اگر چه میزان مرگ و میر در مقایسه با روش آلوده‌سازی مستقیم کمتر بود. میزان LC_{50} و LT_{50} محاسبه شده نیز در این روش بیشتر از روش آلوده‌سازی به روش مستقیم بود. شته‌های مومیایی شده نیز با قارچ آلوده شدند، اما انتقال این آلودگی به شفیره‌های زنبور داخل پوسته‌ی مومیایی کمتر بود. تعداد کمی از حشرات خارج شده از این شفیره‌ها نیز در اثر قارچ آلوده بودند. نتایج آزمایش‌های بعدی نشان داد که آلودگی در اثر تماس با پوسته‌ی شته‌های مومیایی آلوده به قارچ ایجاد شده و از طریق انتقال درونی اتفاق نیفتاده است.

واژگان کلیدی: *Aphidius nigripes* - *Lecanicillium muscarium* رابطه‌ی پاتوژن-پارازیتوئید، حساسیت، کنترل

بیولوژیک

Abstract

Susceptibility of *Aphidius nigripes* Ashmead adults to entomopathogen *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams was evaluated with different inoculation methods. Fungus concentrations including 10^4 ، 10^5 ، 10^6 ، 10^7 ، 10^8 spores/ml and control (distilled water with 0/04% triton x-100) were applied by spraying or dipping method on males, females and pupa of parasitoid and mortality was counted daily

during 8 days. Both *A. nigripes* males and females were infected by *L. muscarium* concentrations. Minimum mortality was observed in 10^4 spores/ml treatment on the males and females after 8 days. Positive correlation was observed between concentrations and parasitoid mortality. Direct infection method with 10^8 spores/ml showed the maximum mortality of 97/9% and 100% for females and males, respectively. Estimated LC_{50} for females was approximately three times more than that of males. LT_{50} for each concentration indicated more susceptibility of males than the females. Adult wasps were also infected by fungus spores of inoculated plants; however, the mortality of parasitoid was less than that of direct infection (sprayed on adults). Estimated LC_{50} and LT_{50} were also greater than those obtained by direct infection of adults. Mummified aphids were infected by *L. muscarium*, however, the development of fungus mycelium was observed on mummies, and the mortality of parasitoid pupae within mummies was significantly low. A few parasitoids emerged from infected mummies suffered mortality. Further results demonstrated that the adult infection had come in touch with the infected mummies.

Key words: *Lecanicillium muscarium*, *Aphidius nigripes*, parasitoid-pathogen interaction, susceptibility, biological control

مقدمه

چگونگی به کارگیری عوامل بیولوژیک از نظر اثراتی که روی یکدیگر می‌گذارند می‌تواند تا حد زیادی تعیین‌کننده‌ی کارآیی برنامه‌ی کنترل بیولوژیک باشد (Hochberg & Lawton, 1990). رابطه‌ی بین پارازیتوئید-بیمارگر شامل جنبه‌های مثبت و منفی است. رابطه‌ی مثبت بین پارازیتوئید و بیمارگر می‌تواند انتشار بیمارگرها توسط پارازیتوئیدها باشد. نقش پارازیتوئیدها به عنوان ناقلین بیمارگرها در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده‌است (Van Lenteren *et al.*, 1980). پارازیتوئیدها بیشتر به عنوان ناقلین ساده‌ی مکانیکی قارچ‌های بیمارگر حشرات تلقی می‌شوند. این انتقال به علل مختلف، مانند آلوده شدن قسمت‌های مختلف بدن پارازیتوئید بر اثر تماس با میزبان آلوده، غذای آلوده‌ی میزبان و یا انتقال مستقیم قارچ به بدن میزبان از طریق تخم‌ریز آلوده، اتفاق می‌افتد (Brooks, 1993). علاوه بر اثرات مثبت بین عوامل کنترل‌کننده‌ی بیولوژیک و میزبان آنها، اثرات منفی نیز قابل توجه هستند. مرگ حشرات کامل و نابالغ میزبان، مسمومیت پارازیتوئید با سم تولید شده توسط بیمارگر و تغییرات فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای میزبان از جمله‌ی آنها می‌باشد. مرگ زود هنگام میزبان نتیجه‌ی بسیار معمول پارازیتوئید-بیمارگر می‌باشد که در مواردی سبب مرگ پارازیتوئیدها می‌شود (Hoch *et al.*, 2001).

پارازیتوئیدها طی دوران رشدی خود داخل بدن میزبان‌های آلوده ممکن است به طور مستقیم نسبت به بیمارگر حساس باشند. یکی از اثرات منفی بیمارگرها که از نقطه نظر کاربردی دارای اهمیت بیشتری می‌باشد، آلودگی حشرات کامل پارازیتوئید و یا شکارگر در زمان کاربرد و یا در دوره‌ی فعالیت‌های زیستی آنهاست. بعضی گزارش‌ها چنین نشان می‌دهد

که برخی از قارچ‌های بیمارگر قادرند شفیره‌ها و حشرات کامل پارازیتوئید را به طور مستقیم آلوده کنند (Geotzel *et al.*, 1990). نتایج تحقیقات Balazy (1981) نشان داد که قارچ *Erynia radicans* (Bref.) Humber, Ben Ze'ev & R. G. Kenneth قادر است حشره‌ی کامل *Pteromalus* sp. و *Lissonota* sp. *Cratichneumon lanii* (Gravenhorst) (1979) Ekbom نیز اعلام کرد که حشره‌ی کامل *Encarsia formosa* Gahan گاهی توسط قارچ *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viégas آلوده می‌شود، هر چند که این قارچ در سطح وسیع برای کنترل سفیدبالک گلخانه *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) بدون هیچ تأثیر جدی روی پارازیتوئید استفاده می‌شود (Hall, 1981). همچنین، EL-Maghraby *et al.* (1988) گزارش کردند که هنگامی که پارازیتوئید *Microplitis rufiventris* Kok. در بدن میزبان خود یعنی *Spodoptera littoralis* (Boisd.) به قارچ *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. آلوده می‌شود، بعضی شفیره‌ها از بین رفته و در نتیجه میزان خروج حشرات کامل کاهش می‌یابد.

با توجه به مطالب فوق چنین دریافت می‌شود که اثرات منفی رابطه‌ی پارازیتوئید-بیمارگر، در کارایی پارازیتیسیم یا بیمارگری و کنترل بیولوژیک مطلوب، مؤثر خواهد بود. لذا تحقیق حاضر با انجام آزمایش‌های متعدد در نظر دارد با تنظیم زمان کاربرد قارچ و پارازیتوئید، بهترین زمان را که حداقل اثرات منفی را در برنامه‌ی کنترل بیولوژیک داشته باشد به دست آورد. در همین راستا، حساسیت حشرات کامل *Aphidius nigripes* Ashmead نسبت به قارچ بیمارگر *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & Gams و همچنین روش‌های مختلف آلوده شدن آنها به قارچ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

زنبور پارازیتوئید *A. nigripes* و شته‌ی میزبان آن، *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) از طبیعت جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. شته‌های بکرزا روی گیاه سیب‌زمینی مستقر شدند. پس از استقرار، پوره‌های سن ۳ در اختیار زنبور قرار گرفتند و پس از تشکیل کلنی زنبور، شته‌های مومیایی شده جمع‌آوری و حشرات کامل نر و ماده برای بررسی‌های بعدی به صورت جداگانه نگهداری و با آب عسل تغذیه شدند. شرایط نگهداری کلنی‌ها، دمای ۲۰-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۵-۷۰٪ و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود.

قارچ *L. muscarium* روی محیط مایع YMPD کشت داده شد. پس از ۴ روز بلاستوسپورها جمع‌آوری و پس از جدا کردن ریشه‌ها با استفاده از پارچه‌ی ململ، تعداد آنها به کمک لام هماسیتومتر شمارش و غلظت آن به عنوان پایه تعیین گردید. سایر غلظت‌ها بر اساس نیاز آزمایش از 10^4 تا 10^8 اسپور در میلی‌لیتر از غلظت پایه تهیه و به صورت تازه مورد استفاده قرار گرفت.

برای بررسی اثر قارچ روی حشره‌ی کامل زنبور به روش آلوده‌سازی مستقیم، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (با تعداد نمونه‌های نامساوی) و ۶ تیمار به طور جداگانه روی زنبورهای نر و ماده انجام شد. هر تیمار حشرات نر تعداد ۴۳ تا ۶۱ زنبور و هر تیمار حشرات ماده ۲۸ تا ۶۳ زنبور را شامل می‌شد. تیمارها شامل غلظت‌های 10^4 ، 10^6 ، 10^7 و 10^8 اسپور در میلی‌لیتر (حاصل از آزمایش‌های اولیه) به همراه تیمار شاهد (آب مقطر به همراه تریتون X-100 به میزان ۰/۰۴٪) بود. حشرات نر و ماده پس از بی‌هوش شدن توسط CO_2 ، به طور جداگانه در غلظت‌های قارچ به مدت ۵ ثانیه فرو برده شدند (روش غوطه‌ورسازی). زنبورها پس از هوادهی و خشک شدن به قفس‌های پلاکسی‌گلاس به ابعاد 14×7 سانتی‌متر با دمای محیط 1 ± 21 درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 1 ± 99 ٪ و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، منتقل شده و با آب عسل ۱۰٪ تغذیه شدند. نمونه‌برداری از مرگ و میر زنبورها تا ۸ روز بعد انجام شد.

برای بررسی اثر قارچ روی حشره‌ی کامل زنبور به روش آلوده‌سازی غیر مستقیم (دریافت اسپور قارچ از برگ‌های آلوده)، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (با تعداد نمونه‌های نامساوی) و ۶ تیمار با زنبورهای نر و ماده به طور جداگانه روی گیاهان آلوده به قارچ انجام شد. به ازای هر تیمار بین ۲۶ تا ۶۵ زنبور نر و ۲۰ تا ۴۷ زنبور ماده به کار رفت. در این روش ابتدا اندام هوایی گیاه میزبان (سیب‌زمینی) با یکی از غلظت‌های 10^4 ، 10^6 ، 10^7 و 10^8 و آب مقطر به همراه تریتون X-100 به میزان ۰/۰۴٪ (شاهد) با استفاده از یک سم‌پاش دستی آلوده شد. گیاهان آلوده شده با قارچ در محفظه‌هایی از جنس پلاکسی‌گلاس به ابعاد 14×7 سانتی‌متر قرار داده شده و در گلدان‌هایی با غذای مایع تغذیه شدند. سپس زنبورهای نر و ماده در هر یک از گلدان‌ها رهاسازی شده و تحت شرایطی همانند آزمایش قبل نگهداری

شدند. نمونه‌برداری از مرگ و میر زنبورها تا ۸ روز انجام و با میکروسکوپ نوری، آلودگی زنبورها به قارچ کنترل شد.

آزمایش مربوط به بررسی اثر قارچ روی شفیره و حشره‌ی کامل زنبور از طریق آلوده‌سازی شته‌های مومیایی شده نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد که شامل ۶ تیمار و ۳ تکرار بود. شرایط دما و رطوبت نسبی، به ترتیب 1 ± 21 درجه‌ی سانتی‌گراد و $1 \pm 99\%$ در نظر گرفته شد. تعداد شته‌های مومیایی شده که حاوی شفیره‌های پارازیتوئید بود، به ازای هر تیمار بین ۵۹ تا ۷۱ عدد بود. همانند آزمایش‌های قبل، پس از آماده شدن غلظت‌های قارچ، شته‌های مومیایی شده (حداکثر یک روزه) به مدت ۵ ثانیه در آن غوطه‌ور شدند. در مدت ۱۰ روز بعد از آزمایش، مرگ و میر شفیره‌های زنبور درون شته‌های مومیایی مورد بررسی قرار گرفت. زنبورهای خارج شده از شفیره‌های زنده در شرایط دمایی 1 ± 21 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی $1 \pm 99\%$ نگهداری و با آب عسل ۱۰٪ تغذیه شدند. مرگ و میر این زنبورها نیز تا ۸ روز بعد مورد بررسی قرار گرفته و با استفاده از میکروسکوپ نوری، آلودگی آنها به قارچ بررسی شد. هدف از انجام این آزمایش، بررسی آلودگی غیر مستقیم، یعنی امکان انتقال قارچ هنگام خروج حشرات کامل از شته‌های مومیایی آلوده بود.

در ادامه این سؤال مطرح شد که آیا آلودگی زنبورهای خارج شده از شته‌های مومیایی درونی است یا در اثر تماس با اسپورهای سطح بدن شته‌های مومیایی آلوده می‌باشد. لذا آزمایشی با ۲ تیمار شامل شته‌های مومیایی آلوده شده با غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر (غلظت کشنده) و شاهد (آب مقطر همراه با تریتون X-100 به میزان ۰/۰۴٪) انجام شد. شته‌های مومیایی شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای 1 ± 21 درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی $1 \pm 99\%$ و سپس در رطوبت نسبی ۷۰٪ قرار گرفتند. قبل از خروج زنبورها برای رفع آلودگی از قارچ، سطح بدن شته‌های مومیایی با هیپوکلرید سدیم ۱٪ و آب مقطر به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شد. حشرات کامل بعد از خروج در شرایط رطوبت نسبی $5 \pm 70\%$ نگهداری شده و تا ۸ روز بعد مرگ و میر آنها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با مشاهده‌ی میکروسکوپی، آلودگی بدن زنبورها به قارچ، مورد بررسی قرار گرفت.

پس از برداشت اطلاعات مربوط به هر آزمایش، محاسبه‌ی غلظت کشنده برای ۵۰٪ از جمعیت (LC_{50}) به روش تجزیه‌ی رگرسیون پروبیت با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. برای

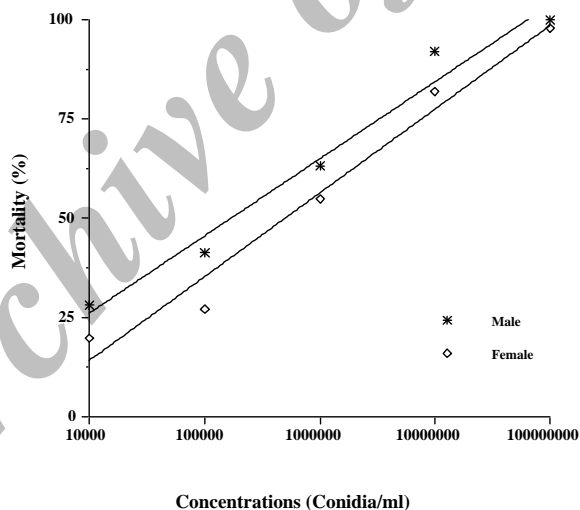
محاسبه‌ی زمان لازم برای ایجاد ۵۰٪ مرگ و میر در جمعیت (LT₅₀) از برنامه Life Test نرم‌افزار SAS استفاده شد. برای رسم نمودارها، نرم‌افزار Cricket graph مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

بر اساس نتایج حاصل از هر آزمایش، چگونگی و میزان آلودگی *A. nigripes* به *L. muscarium* متفاوت بود. در روش آلوده‌سازی مستقیم، زنبورهای نر و ماده نسبت به قارچ *L. muscarium* حساسیت نشان دادند، اما میزان آلودگی بر اساس غلظت قارچ متفاوت بود، به طوری که کمترین میزان آلودگی بعد از ۸ روز مربوط به غلظت ۱۰^۴ اسپور در میلی‌لیتر با میانگین ۱۹/۷۷٪ برای زنبور ماده و ۲۸/۱۲٪ برای زنبور نر بود. روند افزایش مرگ و میر زنبورها با افزایش غلظت رابطه‌ی مستقیم داشت، به طوری که بیشترین مرگ و میر مربوط به غلظت ۱۰^۸ اسپور در میلی‌لیتر با ۹۷/۹٪ برای زنبور ماده و ۱۰۰٪ برای زنبور نر بود (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). میزان مرگ و میر زنبورها در طول زمان نشان داد که بین بقای زنبورها و غلظت قارچ رابطه‌ی عکس وجود دارد. هر چند که برای غلظت‌های مشابه تفاوتی در میزان بقای زنبورهای نر و ماده در طول مدت ۸ روز دیده نشد (شکل‌های ۲ و ۳). همچنین غلظت لازم برای ایجاد ۵۰٪ مرگ و میر برای زنبورهای نر و ماده محاسبه شد (جدول ۱). میزان LC₅₀ محاسبه شده برای حشره‌ی نر معادل ۲/۵ × ۱۰^۵ و برای حشره‌ی ماده ۷/۷ × ۱۰^۵ اسپور در میلی‌لیتر بود که تقریباً سه برابر بیشتر از حشره‌ی نر می‌باشد (شکل ۱). مقایسه‌ی حدود بالا و پایین برای هر دو مقدار LC₅₀، هم‌پوشانی آنها را نشان می‌دهد که حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین آنهاست. شیب خط رگرسیون برای هر دو جنس نر و ماده تقریباً یکسان به نظر می‌رسد؛ در حالی که فاصله از مبدأ برای زنبورهای نر بزرگ‌تر می‌باشد که حاکی از حساسیت بیشتر آنها به قارچ است (جدول ۱، شکل ۱). مدت زمان لازم برای ایجاد ۵۰٪ مرگ و میر در جمعیت زنبورها (LT₅₀) به علت کم بودن مرگ و میر برای برخی از غلظت‌ها قابل محاسبه نبود. اما این مدت برای غلظت ۱۰^۸ اسپور در میلی‌لیتر برای حشره‌ی ماده معادل ۵ روز و برای حشره‌ی نر ۴ روز بود که تأییدکننده‌ی حساسیت بیشتر زنبور نر نسبت به ماده در مقابل قارچ می‌باشد. میزان LT₅₀ برای غلظت ۱۰^۷ اسپور در میلی‌لیتر برای حشره‌ی نر و ماده معادل ۵ روز

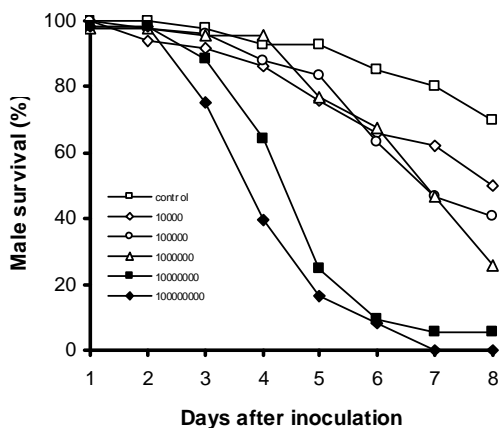
و برای غلظت‌های 10^6 و 10^5 نیز ۷ روز برای حشره‌ی نر و ماده محاسبه شد. زنبور نر و ماده از طریق آلودگی برگ‌های گیاه به قارچ *L. muscarium* بیمار شدند، ولی میزان آلودگی بر اساس غلظت قارچ متفاوت بود.

کمترین میزان آلودگی بعد از ۸ روز مربوط به غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر با میانگین $35/67\%$ برای حشره‌ی ماده و $16/73\%$ برای حشره‌ی نر بود (شکل ۴). مرگ و میر در جمعیت زنبورها با افزایش غلظت قارچ رابطه‌ی مستقیم داشت، به طوری که بیشترین میزان مرگ و میر مربوط به غلظت 10^8 اسپور در میلی‌لیتر با $77/6\%$ برای حشره‌ی ماده و 100% برای حشره‌ی نر بود. میزان زنده‌مانی زنبورهای نر و ماده در طول مدت ۸ روز پس از شروع آلودگی با گذشت زمان و افزایش غلظت رابطه‌ی معکوس داشت (شکل‌های ۵ و ۶)، به طوری که در روز هفتم، مرگ و میر حشره‌ی نر تحت تأثیر آلودگی با غلظت 10^8 اسپور در میلی‌لیتر حداکثر بود،



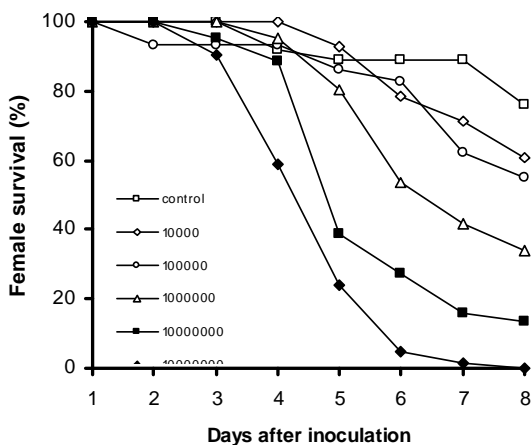
شکل ۱. درصد مرگ و میر ایجاد شده توسط قارچ *L. muscarium* روی زنبورهای نر و ماده ۸ روز پس از آلوده‌سازی به روش مستقیم.

Fig. 1. Induced mortality by *L. muscarium* on male and female *A. nigripes*, 8 days after the inoculation by direct inoculation method.



شکل ۲. زنده‌مانی زنبورهای نر *A. nigripes* در مدت ۸ روز پس از آلودگی با قارچ *L. muscarium* به روش آلوده‌سازی مستقیم.

Fig. 2. Survival of *A. nigripes* males during 8 days after inoculation with *L. muscarium* by direct inoculation method.



شکل ۳. زنده‌مانی زنبورهای ماده‌ی *A. nigripes* در مدت ۸ روز پس از آلودگی با قارچ *L. muscarium* به روش آلوده‌سازی مستقیم.

Fig. 3. Survival of *A. nigripes* females during 8 days after inoculation with *L. muscarium* by direct inoculation method.

جدول ۱. مقادیر LC_{50} محاسبه شده برای قارچ *L. muscarium* روی زنبورهای نر و ماده‌ی *A. nigripes* ۸ روز پس از آلوده‌سازی به روش مستقیم.

Table 1. Estimated LC_{50} for *L. muscarium* on the males and females of *A. nigripes*, 8 days after the inoculation by direct inoculation method.

Sexual	LC_{50} (95% fiducial limits) ^a	Intercept \pm SE	Chi-square	Pr > Chi
Male	2.5×10^5 ($9.1 \times 10^5 - 9.7 \times 10^3$)	-8.7547565 ± 2.683478	10.64369	0.0011
Female	7.7×10^5 ($2.3 \times 10^6 - 5.6 \times 10^4$)	-7.7202016 ± 2.561579	9.08325	0.0026

^a Lower - Upper; SE = Standard Error

ولی بقای حشره‌ی ماده تا روز هشتم ادامه داشت. این موضوع بیانگر حساسیت بیشتر نرها در مقابل غلظت‌های بالای قارچ بود. غلظت‌های پایین‌تر قارچ، آلودگی کمتری را چه در زنبور نر و چه در زنبور ماده از طریق آلودگی غیر مستقیم ایجاد نمود. مقدار LC_{50} محاسبه شده برای حشره‌ی نر معادل $10^5 \times 4/8$ و برای حشره‌ی ماده $10^6 \times 1/2$ اسپور در میلی‌لیتر بود (شکل ۴). مقایسه‌ی حدود بالا و پایین LC_{50} برای حشره‌ی نر و ماده حاکی از هم‌پوشانی بین آنهاست که بر این اساس نمی‌توان تفاوت معنی‌داری را بین آنها قایل شد؛ هرچند که LC_{50} محاسبه شده برای حشره‌ی ماده $2/5$ برابر بیشتر از حشره‌ی نر است و تأییدکننده‌ی حساسیت بیشتر حشره‌ی نر نسبت به قارچ می‌باشد (جدول ۲). مدت زمان لازم برای مرگ و میر 50% زنبورها (LT_{50}) به دلیل مرگ و میر پایین برای برخی از غلظت‌ها قابل محاسبه نبود. این مقدار برای حشره‌ی نر و ماده در اثر غلظت 10^8 اسپور در میلی‌لیتر ۶ روز، در اثر غلظت 10^7 اسپور در میلی‌لیتر برای حشره‌ی نر ۷ و برای حشره‌ی ماده ۶ روز، و در اثر غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر برای حشره‌ی نر ۶ و برای حشره‌ی ماده $7/5$ روز تعیین شد.

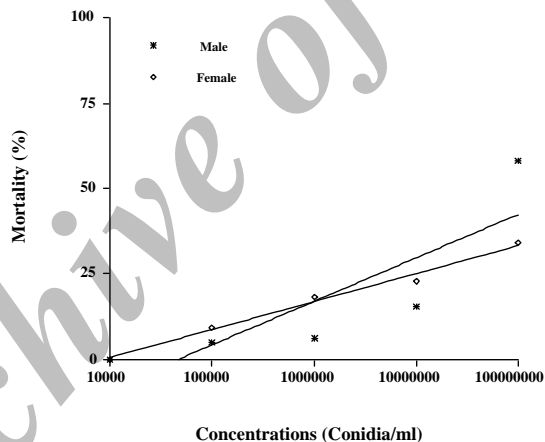
شته‌های مومیایی شده که حاوی شفیره‌ی زنبور بودند توسط غلظت‌های مختلف قارچ آلوده شد که رشد قارچ روی آنها مشهود بود. با افزایش غلظت قارچ، تعدادی از شفیره‌های زنبور دچار مرگ و میر شده و حشره‌ی کاملی از آنها خارج نشد. آلودگی شفیره‌ها نسبت به غلظت‌های قارچ اختلاف معنی‌داری نداشت ($Pr > 0/1$, $Ch-sqr = 2/6$, $LC_{50} = 1/0.2 \times 10^{11}$). در حالی که غلظت‌های قارچ روی زنبورهای خارج شده از شفیره‌ها اثر معنی‌داری داشت ($Pr > 0/0001$, $Ch-sqr = 24/6$, $LC_{50} = 1/1 \times 10^7$). بر اساس غلظت‌های به کار رفته تعدادی از حشرات کامل خارج شده از شته‌های مومیایی نیز بعد از ۸ روز دچار مرگ و میر شدند.

جدول ۲. مقادیر LC_{50} محاسبه شده برای قارچ *L. muscarium* روی زنبورهای نر و ماده‌ی *A. nigripes* ۸ روز پس از آلوده‌سازی به روش غیر مستقیم (دریافت اسپور قارچ از برگ‌های آلوده).

Table 2. Estimated LC_{50} for *L. muscarium* on the males and females of *A. nigripes*, 8 days after the inoculation by indirect inoculation method (receiving spores from inoculated plants).

Sexual	LC_{50} (95% fiducial limits) ^a	Intercept \pm SE	Chi-square	Pr > Chi
Male	4.8×10^5 (1.7×10^6 - 3.3×10^4)	-8.1032922 ± 2.358983	11.799796	0.0006
Female	1.2×10^6 (1.7×10^5 - 5.2×10^6)	-7.523697 ± 1.04183	15.61152	0.0001

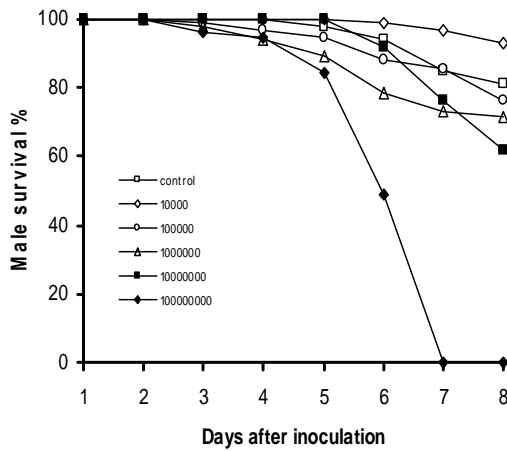
^a Lower - Upper; SE = Standard Error



شکل ۴. مرگ و میر ایجاد شده توسط قارچ *L. muscarium* روی زنبورهای نر و ماده‌ی *A. nigripes* ۸ روز پس از آلوده‌سازی به روش غیر مستقیم (دریافت اسپور قارچ از برگ‌های آلوده).

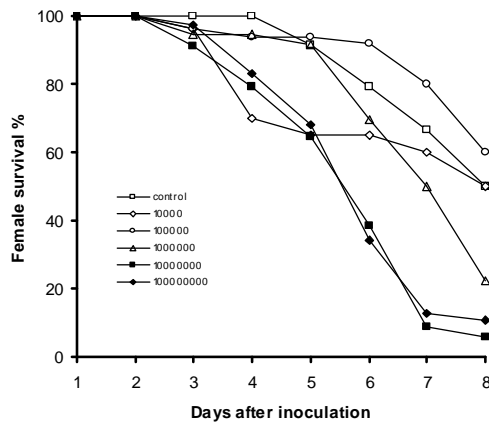
Fig. 4. Induced mortality by *L. muscarium* on male and female *A. nigripes*, 8 days after the inoculation by indirect inoculation method (receiving spores from inoculated plants).

کمترین میزان آلودگی سفیره‌ها و حشرات کامل خارج شده پس از ۱۰ روز، مربوط به غلظت 10^4 و به ترتیب ۰/۸۲٪ و ۳/۳۳٪ بود. روند افزایش مرگ و میر سفیره و حشره‌ی کامل



شکل ۵. درصد زنده‌مانی زنبورهای نر *A. nigripes* در مدت ۸ روز پس از آلوده‌سازی با قارچ *L. muscarium* به روش غیر مستقیم (دریافت اسپور قارچ از برگ‌های آلوده).

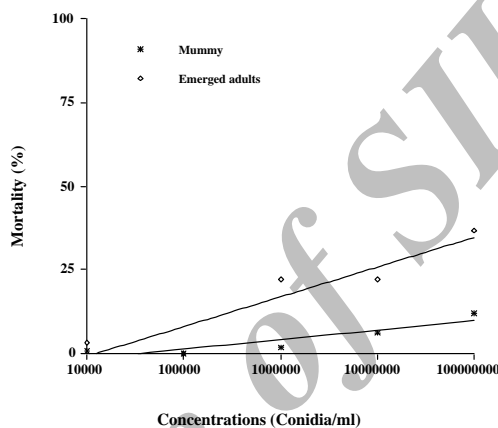
Fig. 5. Survival of *A. nigripes* males during 8 days after inoculation with *L. muscarium* by indirect inoculation method (receiving spores from inoculated plants).



شکل ۶. درصد زنده‌مانی زنبورهای ماده‌ی *A. nigripes* در مدت ۸ روز پس از آلوده‌سازی با قارچ *L. muscarium* به روش غیر مستقیم (دریافت اسپور قارچ از برگ‌های آلوده).

Fig. 6. Survival of *A. nigripes* females during 8 days after inoculation with *L. muscarium* by indirect inoculation method (receiving spores from inoculated plants).

با افزایش غلظت قارچ نسبت مستقیم داشت (شکل ۷). بیشترین میزان مرگ و میر مربوط به غلظت 10^8 با $11/9\%$ برای شفیره و $36/64\%$ برای حشره‌ی کامل به دست آمد. مقدار LC_{50} محاسبه شده برای شفیره‌ها معادل $10^1 \times 1/02$ اسپور در میلی‌لیتر بود (شکل ۷).



شکل ۷. مرگ و میر ایجاد شده توسط قارچ *L. muscarium* روی شفیره و حشره‌ی کامل *A. nigripes* خارج شده از شته‌ی مومیایی آلوده شده، ۱۰ روز پس از آلودگی.

Fig. 7. Induced mortality by *L. muscarium* on pupa and adult *A. nigripes* emerged from infected mummies, 10 days after inoculation.

شیب خط رگرسیون برای مرگ و میر ایجاد شده توسط غلظت‌های قارچ در شفیره کمتر از حشره‌ی کامل بود که معرف مرگ و میر با شدت بیشتر زنبورها نسبت به شفیره‌ها است. مدت زمان لازم برای ایجاد 50% مرگ و میر در زنبورها به علت پایین بودن میزان مرگ و میر برای بیشتر غلظت‌ها قابل محاسبه نبود، اما این مدت برای غلظت 10^8 اسپور در میلی‌لیتر، ۸ روز (حد پایین ۷ و حد بالا ۹ روز) به دست آمد.

زنبورهای پارازیتوئید خارج شده از شته‌های مومیایی شده که با غلظت 10^7 از اسپورهای قارچ تیمار و در شرایط غیر مرطوب نگهداری شده بودند، مرگ و میر معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد نشان ندادند. در روش به کار گرفته شده و شرایط آزمایشی فوق، میانگین مرگ و میر شفیره‌های آلوده $5/33\%$ و شفیره‌های شاهد $2/66\%$ بود. نتایج حاصل چنین نشان داد که

اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود نداشته و آلودگی قارچی از طریق انتقال درونی از شفیره‌ها به حشرات کامل نبوده است ($F = 1/9$, $df = 1$, $P = 0/2377$).

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که قارچ *L. muscarium* روی زنبورهای نر و ماده‌ی *A. nigripes* اثر بیماری‌زایی دارد؛ هر چند که درصد آلودگی ایجاد شده در زنبورها به روش آلوده‌سازی مستقیم و غیر مستقیم متفاوت بود. در آلوده‌سازی غیر مستقیم، زنبورها با راه رفتن و تماس با سطح برگ‌ها آلوده شدند. نتایج نشان داد که احتمال آلوده شدن به طریق غیر مستقیم کمتر از آلوده شدن به روش مستقیم است. فرضیه‌ی مورد آزمون در این تحقیق که مبتنی بر تعیین اثر قارچ‌های بیمارگر حشرات روی دشمن طبیعی دیگر از یک میزبان مشترک بنا شده بود، توسط محققین دیگری نیز مورد بررسی قرار گرفته است. به طور مثال طبق گزارشات (Valesco 1983)، هنگامی که برای کنترل پروانه‌ی پشت‌الماسی دو عامل کنترل بیولوژیک مهم آن یعنی زنبور پارازیتوئید *Apanteles plutella* Kurdj. و قارچ *E. radicans* به کار گرفته شدند، حشرات کامل به قارچ آلوده شده و بقای آنها و میزان پارازیتسم کاهش یافت. همچنین (Los & Allen 1983) اظهار داشتند که هنگام به کارگیری زنبور پارازیتوئید *Bathyplectes anurus* (Thomson) و قارچ *Zoophthora phytonomi* (Arthur) Batko علیه سرخرطومی یونجه، حشرات کامل پارازیتوئید نسبت به قارچ آلودگی نشان دادند، که این نتایج با نتایج آزمایش‌های تحقیق حاضر تطابق دارد.

گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که علاوه بر قارچ‌ها، سایر بیمارگرها نظیر ویروس‌ها، باکتری‌ها و نماتدها نیز موجب آلودگی پارازیتوئیدها می‌شوند. (Flexner et al. 1986) گزارش کردند که هنگام استفاده هم‌زمان از باکتری و پارازیتوئید در کنترل پروانه‌ی پشت‌الماسی، باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner ۶۸٪ جمعیت حشرات کامل پارازیتوئید *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) را کاهش داد. (Salama et al. 1982) کاهش میزان خروج حشرات کامل پارازیتوئید *Microplitis demolitor* Wilkinson و کاهش میزان تولیدمثل آنها را زمانی که لاروها از باکتری *B. thuringiensis* تغذیه کرده بودند، گزارش نمودند. میزان مرگ و

میر پارازیتوئید در اثر بیمارگر، تحت تأثیر غلظت مورد استفاده می‌باشد. تحقیقات (1991) Salama et al. نشان داد که با افزایش غلظت *B. thuringiensis* در کنترل شب‌پره هندی، میزان خروج پارازیتوئیدهای *Bracon brevicornis* Wesmael و طول عمر ماده‌های آنها کاهش یافت. این نتایج با نتایج تحقیقات حاضر مطابقت داشته و ارتباط مستقیم افزایش غلظت با افزایش مرگ و میر پارازیتوئید را به اثبات می‌رساند. در این خصوص، ارتباط مستقیم بین افزایش غلظت قارچ با افزایش مرگ و میر شکارگرها نیز گزارش شده است؛ چنان‌که با افزایش غلظت قارچ‌های *Metarhizium anisopliae* (Metch.) Sorokin و *B. bassiana* از 10^4 تا 10^8 اسپور در میلی‌لیتر، مرگ و میر کفشدوزک *Hippodamia convergens* Guérin-Meneville افزایش یافت (James Lighthart, 1994).

طبق تحقیقات (1995) De la Rosa-Reyes et al. زمانی که قارچ *B. bassiana* و زنبور طبق تحقیقات (1995) De la Rosa-Reyes et al. که هر دو از عوامل کنترل‌کننده‌ی سوسک قهوه می‌باشند با هم به کار گرفته شوند، غلظت‌های مختلف قارچ اثر منفی معنی‌داری روی قابلیت پارازیت‌سیسم زنبورها ندارد. این در حالی است که پارازیتوئید دیگر این آفت، یعنی *Cephalonomia stephanoderis* Betrem در مقایسه با *P. nasuta* مقاومت بیشتری به قارچ نشان داد. (1986) Powell et al. اعلام کردند که پارازیتوئیدها و قارچ‌ها بیمارگری که به طور هم‌زمان برای کنترل شته‌های غلات به کار گرفته می‌شوند، بدون ایجاد آلودگی قارچ روی زنبور، میزان را کنترل می‌نمایند. (1940) Ullyett & Schonken به این نتیجه رسیدند که زمانی که قارچ *E. radicans* و زنبور *Angitia* sp. به لاروهای پروانه‌ی پشت‌الماسی حمله کردند، اثر بازدارنده‌ی روی یکدیگر نشان ندادند. (1997) Blumberg et al. گزارش کردند که باکتری *B. thuringiensis* روی میزان زنده‌مانی حشرات کامل پارازیتوئید *Microplitis croceipes* (Cresson) اثر سوئی ندارد. میزان اثرات منفی یک عامل بیمارگر روی یک پارازیتوئید به مکانیسم عمل آن، شرایط ساختمانی و یا فیزیولوژیک عامل بیمارگر و پارازیتوئید، و یا به رفتارهای آنها بستگی دارد. به عنوان مثال، رفتار تمیز کردن بدن در پارازیتوئیدها (grooming) تا حدودی اسپورهای قارچ را از بدن دور نموده و سبب کاهش بیمارگری قارچ می‌شود. در تحقیق حاضر نشان داده شد که سفیره‌ی پارازیتوئید داخل پوسته‌ی مومیایی شده‌ی شته حساسیت کمتری را نسبت به قارچ از خود نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد لایه‌ی مومی کوتیکول در شته‌ی مومیایی شده، نقش مؤثری

در مقاومت شفیره نسبت به نفوذ قارچ داشته و آن را در مقابل آلودگی مستقیم محافظت می‌نماید.

در مورد نقش آلوده‌سازی گیاهان میزبان در میزان زنده‌مانی حشرات، Fransen et al. (1987) اظهار داشتند که لاروهای فعال و پرتحرک سن اول سفیدبالک گلخانه که روی برگ‌های آلوده به قارچ حرکت می‌کنند، به علت تماس بدن با اسپورها آلوده شدند. هر چه تحرک لاروها بیشتر باشد تماس آنها با سطوح آلوده‌ی برگ‌ها بیشتر بوده و احتمال آلودگی بالا می‌رود. این در حالی است که بر اساس تحقیقات این محققین، جنین داخل تخم هنگام آلوده‌سازی به میزان کمتری نسبت به لاروهای خارج شده از تخم دچار آلودگی می‌شود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میزان آلودگی در زنبورها با افزایش غلظت قارچ ارتباط مستقیم دارد. اگر هر کنیدی به میزان یک احتمال برای ایجاد آلودگی در نظر گرفته شود بنابراین طبیعی خواهد بود که با افزایش غلظت قارچ، درصد آلودگی افزایش پیدا کند. نتایج حاصل با نتایج Askary & Brodeur (1998) که گزارش کرده بودند با افزایش غلظت قارچ *L. muscarium* درصد آلودگی شته‌های *M. euphorbiae* و *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) افزایش پیدا می‌کند، مطابقت دارد. میزان آلودگی در بین افراد نر و ماده پارازیتوئید نیز متفاوت بود، چنانکه زنبورهای نر حساسیت بیشتری نسبت به ماده‌ها نشان دادند. از آنجا که حشرات نر فعال‌تر، جنه‌ی کوچک‌تر و طول عمر کوتاه‌تری نسبت به ماده‌ها دارند، بنابراین با تعداد اسپور مساوی در سطح بدن، احتمال حساسیت آنها نسبت به ماده‌ها بیشتر می‌شود. این نتیجه تا حد زیادی تفاوت LT_{50} محاسبه شده برای حشرات نر و حشرات ماده را توجیه می‌کند.

زنبورهای خارج شده از شته‌های مومیایی آلوده که در شرایط مرطوب نگهداری شده بودند، میزانی از آلودگی را نشان دادند. اما مشخص نبود که این آلودگی در اثر برداشت اسپور از سطح پوسته‌ی شته‌های مومیایی شده بوده یا از طریق آلودگی درونی شفیره‌ها به حشرات کامل منتقل شده است. نتیجه‌ی آزمایش تکمیلی که با نگه‌داشتن زنبورها در شرایط نسبتاً خشک به دست آمد، تأییدکننده‌ی فرضیه‌ی نخست بود؛ یعنی زنبورها از طریق تماس، اسپورهای قارچ را برداشت کرده بودند. بنابراین با قاطعیت می‌توان ادعا نمود که آلودگی درونی شفیره‌ها به حشرات کامل زنبور قابل انتقال نبوده و دو حالت مرگ شفیره و یا زنده بودن آن اتفاق خواهد افتاد. این فرضیه برای Rodriguez-Rueda & Faragues (1980) نیز مورد

سوال قرار گرفت، به طوری که ایشان دریافتند که لاروهای جوان خارج شده از تخم‌های *Otiiorhynchus sulcatus* (Fabricius) که به وسیله‌ی قارچ *M. anisopliae* آلوده شده بودند نیز دچار آلودگی شدند. اما این سؤال همچنان باقی ماند که آیا لاروهای داخل تخم، خود آلوده بودند و یا با برداشتن اسپوره‌های سطح تخم آلوده شده بودند؟

نتایج تحقیق حاضر، حساسیت و احتمال آلودگی حشرات کامل زنبور *A. nigripes* را نسبت به قارچ *L. muscarium* نشان داد. اما محققین مختلف اعتقاد دارند که عوامل بیمارگر حشرات در غلظت‌های بالا و پایین می‌توانند اثرات مختلفی را روی فاکتورهای مهم حیاتی حشرات ایجاد نمایند. به عنوان مثال یکی از سؤالات اساسی این خواهد بود که آیا فعالیت‌های جفت‌گیری و قدرت باروری زنبورهای *A. nigripes* بر اثر آلوده شدن با قارچ *L. muscarium* تحت تأثیر قرار می‌گیرد؟ با پاسخ به این گونه سؤالات می‌توان بهره‌گیری و یا مدیریت استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک را تحت تأثیر قرار داد و در جهت به کارگیری مؤثرتر آنها برنامه‌ریزی نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان از مساعدت‌های مسئولین محترم سازمان ترویج، آموزش و تحقیقات کشاورزی و همچنین موسسه‌ی تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور برای انجام این تحقیق سپاسگزاری به عمل می‌آورند.

منابع

- Askary, H. & Brodeur, J.** (1998) Interspecific competition between the immature aphid parasitoid, *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Braconidae), and the entomopathogenic fungus, *Verticillium lecanii* (Hyphomycete: Deuteromycotina). *Journal of Invertebrate Pathology* 73, 129-132.
- Balazy, S.** (1981) Entomophthoraceous fungi on parasitic Hymenoptera. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences* 29, 227-230.
- Blumberg, D., Navon, A., Keren, S., Goldenberg, S. & Ferkovich, S. M.** (1997) Interactions among *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), its larval

- endoparasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae), and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology* 90, 1181-1186.
- Brooks, W. M.** (1993) Host-parasitoid-pathogen interactions. pp. 231-272 in Beckage, N. E., Thompson, S. N. & Federici, B. A. (Eds) *Parasites and pathogens of insects: pathogens*. 294 pp. Academic Press.
- De la Rosa-Reyes, W., Godinez-Aguilar, J. L. & Alatorre-Rosas, R.** (1995) Biological activity of five strains of *Metarhizium anisopliae* upon the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Col.: Scolytidae). *Entomophaga* 40, 403-412.
- Ekbom, B. S.** (1979) Investigations on the potential of a parasitic fungus (*Verticillium lecanii*) (Hyphomycete: Deuteromycotina) for biological control of the greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) (Homoptera: Aleyrodidae). *Swedish Journal of Agricultural Research* 9, 129-138.
- EL-Maghraby, M. M. A., Hegab, A. & Yousif-Khalil, S. I.** (1988) Interactions between *Bacillus thuringiensis* Berl., *Beauveria bassiana* Bals. Vuill. and the host/parasitoid system *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lepidoptera: Noctuidae)/*Microplitis rufiventris* Kok. (Aphididae). *Journal of Applied Entomology* 106, 417-421.
- Flexner, J. L., Lighthart, B. & Croft, B. A.** (1986) The effects of microbial pesticides on non-target, beneficial arthropods. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 16, 203-254.
- Fransen, J. J., Winkelman, C. & Van Lenteren, J. C.** (1987) The differential mortality at various life stages of the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae), by infection with the fungus *Aschersonia aleyrodica* (Deuteromycotina: Coelomycetes). *Journal of Invertebrate Pathology* 50, 158-165.
- Goettel, M. S., Poprawski, T. J., Vandenberg, J. D., Li, Z. & Roberts, D. W.** (1990) Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. pp. 209-231 in Laird, M., Lacey, L. A. & Davidson, E. W. (Eds) *Safety of microbial insecticides*. 272 pp. CRC Press, Boca Raton.
- Hall, R. A.** (1981) The fungus *Verticillium lecanii* (Hyphomycete: Deuteromycotina) as a microbial insecticide against aphids and scales. pp. 483-498 in Burges, H. D. (Ed.) *Microbial control of pests and plant diseases*. 949 pp. Academic Press.
- Hoch, G., Zubrik, M., Novotny, J. & Schopf, A.** (2001) The natural enemy complex of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) in different phases of its population dynamics in eastern Austria and Slovakia, a comparative study. *Journal of Applied Entomology* 125(5), 217-227.

- Hochberg, M. E. & Lawton, J. H.** (1990) Competition between kingdoms. *Trends in Ecology and Evolution* 5, 367-371.
- James, R. R. & Lighthart, B.** (1994) Susceptibility of the convergent lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae) to four entomogenous fungi. *Journal of Environmental Entomology* 23(1), 190-192.
- Los, M. & Allen, W. A.** (1983) Incidence of *Zoophthora phytonomi* (Zygomycetes: Entomophthorales) in *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae) larvae in Virginia. *Journal of Environmental Entomology* 12, 1318-1321.
- Powell, W., Wilding, N., Brobyn, P. J. & Clark, S. J.** (1986) Interference between parasitoids (Hymenoptera: Aphididae) and fungi (Entomophthorales) attacking cereal aphids. *Entomophaga* 31, 293-302.
- Rodriguez-Rueda, D. & Faragues, J.** (1980) Pathogenicity of entonopathogenic hyphomycetes, *Paecilomyces fumosoreseus* and *Nomuraea rileyi* to eggs of noctuids *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Spodoptera littoralis*. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 36, 399-408.
- Salama, H. S., Zaki, F. N. & Sharaby, A. F.** (1982) Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on parasites and predators of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae). *Zeitschrift für angewandte Entomologie* 94, 498-504.
- Salama, H. S., El-Moursy, A., Zaki, F. N., Aboul-Ela, R. & Abdel-Razek, A.** (1991) Parasites and predators of the meal moth *Plodia interpunctella* Hbn. (Lepidoptera: Phycitidae) as affected by *Bacillus thuringiensis* Ber. *Journal of Applied Entomology* 112, 244-253.
- Ullyett, G. C. & Schonken, D. B.** (1940) A fungus disease of *Plutella maculipennis* (Lepidoptera: Plutellidae) curt in South Africa, with notes on the use of entomogenous fungi in insect control. *Ukion of South Africa: Department of Agriculture for Science Bulletin* 218, 1-24.
- Valesco, L. R. I.** (1983) Field parasitism of *Apanteles plutellae* Kurdj. (Braconidae, Hymenoptera) on the diamond-back moth of cabbage. *Philippines Entomology* 6, 539-553.
- Van Lenteren, J. C., Nell, H. W. & Sevenster-Van der Lelie, L. A.** (1980) The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Hymenoptera: Aphelinidae). IV. Oviposition behaviour of the parasite with aspects of host selection, host discrimination and host feeding. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* 89, 442-454.